

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-154151

(43)Date of publication of application : 06.06.2000

(51)Int.Cl.

A61K 45/00
A61K 31/7048
A61P 1/04
A61P 1/16
A61P 3/10
A61P 11/06
A61P 17/04
A61P 25/28
A61P 29/00
A61P 37/02
A61P 37/06
A61P 37/08
A61P 43/00
C07H 17/07
// A61K 35/78

BEST AVAILABLE COPY

(21)Application number : 11-258650

(71)Applicant : JO KYO

(22)Date of filing : 13.09.1999

(72)Inventor : JO KYO

SAIKI IKUO

CHIN TEI

KOMATSU KATSUKO

(30)Priority

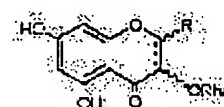
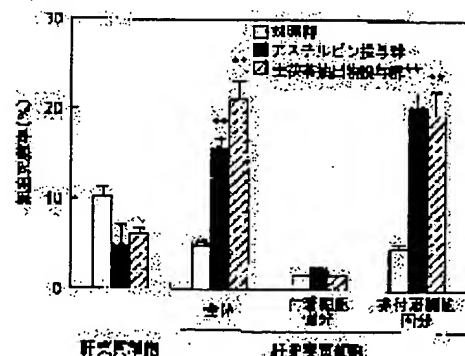
Priority number : 10260412 Priority date : 14.09.1998 Priority country : JP

(54) IMMUNOSUPPRESSANT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an immunosuppressant hardly causing side effects, having a selective apoptosis activity, and useful for treatment of rejection symptom associated with transplantation, autoimmune disease, allergic disease or the like by using an active material selectively suppressing an activated T cell as an active ingredient.

SOLUTION: This immunosuppressant contains an active material such as flavonoids and chromones selectively



suppressing an activated T cell, represented by formula I [R is H or hydroxy-substituted phenyl; Rha is α -L-rhamnose residue; a dotted line represent the presence (absence) of a double bond] and exemplified by a compound of formula II as an active ingredient. Preferably, a plant extract of Smilax glabra Roxb. or the like, containing the flavonoids or the chromones of formula I is used as the active ingredient, and the daily dose of the active ingredient in the case of oral administration is 1-500 mg/person.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-154151

(P2000-154151A)

(43) 公開日 平成12年6月6日(2000.6.6)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード*(参考)

A 6 1 K 45/00
31/7048

A 6 1 K 45/00
31/7048

A 6 1 P 1/04
1/16
3/10

A 6 1 P 1/04
1/16
3/10

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-258650

(22) 出願日 平成11年9月13日(1999.9.13)

(31) 優先権主張番号 特願平10-260412

(32) 優先日 平成10年9月14日(1998.9.14)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 598126047

徐 強

中華人民共和国江蘇省南京市馬家街40号 5
幢 1 单元602室

(72) 発明者 徐 強

中華人民共和国江蘇省南京市馬家街40号 5
幢 1 单元602号室

(72) 発明者 済木 育夫

富山県婦負郡婦中町蜚川151-26

(74) 代理人 100083301

弁理士 草間 攻

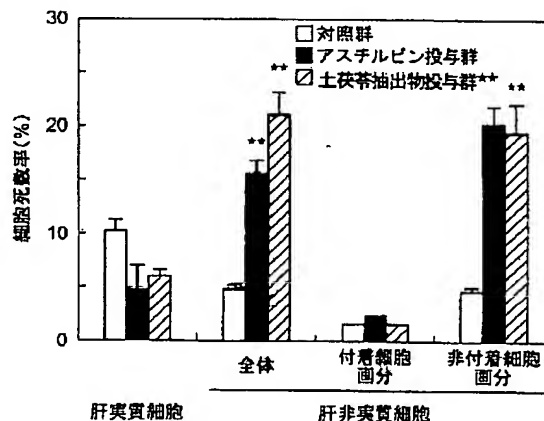
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫抑制剤

(57) 【要約】

【課題】 自己免疫疾患、それに類似する疾患に起因する組織の損傷や感染に伴って起こる炎症反応、組織の線維化および臓器機能障害、臓器移植の拒否反応、骨髄移植による移植片対宿主病、アレルギー疾患に対して、その原因となる活性化T細胞を選択的に抑制する、副作用の少ない、有効な免疫抑制剤の提供。

【解決手段】 活性化T細胞を選択的に抑制する作用物質を有効成分とする免疫抑制剤であり、特に、活性化T細胞の選択的アポトーシスを作用機序とする、免疫抑制剤である。



** : P<0.01 対照群と比較

つつ、外来性の非自己抗原を速やかに、かつ効率的に排除するべく獲得免疫を発達させてきた。

【0003】その免疫系において、中心的な役割を担っているのがT細胞（Tリンパ球）である。末梢にでたばかりのナイーブCD4 T細胞は、細胞表面上のT細胞レセプターを通じて、抗原提示細胞から抗原の提示を受けると同時に、活性化関連分子群からのある種のシグナルにより活性化され、T細胞増殖因子であるIL-2を分泌して増殖する（Thp：ヘルパーT細胞）。このThpがTh0に分化し、その後Th1またはTh2に分かれ、さまざまなサイトカインの産生、さらなる細胞増殖、細胞傷害活性などが誘導される。

【0004】これら一連の免疫応答に異常が起きると、リンパ球とくにT細胞が自己抗原に対して強く反応（自己抗原に対して免疫応答）し、その結果、自己の組織傷害を引き起こすことがあり、これを自己免疫疾患という。これらの免疫異常反応における引き金のひとつとして、ウイルスや細菌に対する本来の免疫応答が、何らかの機構で、自己抗原に対する免疫応答に変わってしまう可能性が指摘されている。この自己免疫疾患により引き起こされた組織の損傷や感染は、種々の炎症反応、さらに組織の線維化、臓器の機能障害等をもたらす。

【0005】一方、正常な免疫応答であっても、臓器移植に伴う拒絶反応や、骨髄（造血幹細胞）移植に伴う移植片対宿主病を抑制することが治療上待望されている。これらで誘導される免疫応答は、基本的に同一であり、活性化されたT細胞が主体をなしている。

【0006】さらに近年、アレルギー疾患における活性化T細胞の役割も注目されている。すなわち、活性化Th2細胞が主に産生するIL-4、IL-5等のサイトカインは、肥満細胞や好酸球を活性化して即時型アレルギーを惹起し、また、活性化Th1細胞が主に産生するIFN- γ 等は、遅延型アレルギーを惹起することが明らかとなってきた。

【0007】したがって、自己免疫疾患や移植免疫、それらに伴う慢性活動性の免疫学的な炎症反応、さらにアレルギー疾患に対する治療のために、活性化T細胞の選択的な抑制を確保し得る薬剤の登場が期待されている。

【0008】このような状況下、T細胞活性化機構におけるメディエーターの制御による治療手段が検討されてきており、シクロスポリンやFK506等によるT細胞に対する強力な免疫抑制効果、抗サイトカイン療法、抗接着分子（活性化関連分子）療法、モノクローナル抗体療法等が注目されている。

【0009】しかしながら、これらの療法も、従来からのグルココルチコイドによる療法と同様に、活性化T細胞選択的とはいえず、副作用等の問題が解決されているものではない。

【0010】ところで、自己免疫疾患は全身性に加えて、ほとんどの臓器においても認めらる疾患である。ま

た今後、臓器移植手術や造血幹細胞移植手術がますます発展するのに伴い、拒絶反応の問題や、移植片対宿主病の問題も増大してくる。さらには、アレルギー性疾患は文明病ともいわれ、一度罹患するとなかなか完治しにくく、現在でも罹患患者数がきわめて多いのが現状である。

【0011】このように、活性化T細胞が中心的な役割を担っている疾患は多岐にわたるものであり、これら疾患に対する有効な治療薬の開発が期待されているものの、いまだ活性化されたT細胞に起因する疾患の治療手段として、活性化T細胞の働きを選択的に抑制するような薬剤は登場していない。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】したがって本発明は、上記した現状に鑑み、自己免疫疾患、自己免疫疾患や類縁疾患に起因する組織の損傷や感染に伴って起こる炎症反応さらに組織の線維化および臓器機能障害、臓器移植の拒絶反応、骨髄（造血幹細胞）移植による移植片対宿主病、さらにアレルギー疾患に対して、その原因となる活性化T細胞を選択的に抑制する、副作用の少ない、臨床的に適応し得る、有効な免疫抑制剤を提供することを基本的課題とする。

【0013】かかる課題を解決するべく、本発明者は鋭意検討をした結果、活性化T細胞の選択的アポトーシスを機序として、活性化したT細胞を選択的に抑制する作用物質を新規に見出した。さらに、この選択的抑制剤がかかる機序により、活性化T細胞起因性の疾患を有効に予防、または治療し得ることを新規に見出して、本発明を完成させるに至った。

【0014】

【課題を解決するための手段】しかして本発明は、その一態様として、活性化したT細胞を選択的に抑制する作用物質を有効成分とする免疫抑制剤を提供する。

【0015】本発明において、活性化したT細胞とは、各種サイトカインを産生、分泌して増殖し、引き続き一連の反応を惹起するT細胞をいう。

【0016】本発明は、かかる活性化したT細胞に対して、選択的なアポトーシスを誘導させ、T細胞自体の働きを抑制することにより、その活性化したT細胞に起因する免疫異常に基づく種々の疾患を予防、または治療することに特徴がある。

【0017】したがって、本発明の活性化したT細胞を選択的に抑制する作用物質を有効成分として含有する免疫抑制剤は、より具体的な態様として、移植に対する拒絶反応；骨髄（造血幹細胞）移植による移植片対宿主病；自己免疫疾患；自己免疫疾患や類縁疾患に起因する組織の損傷や感染に伴って起こる炎症反応、組織の線維化および臓器機能障害；さらにアレルギー疾患に対する治療剤として使用される免疫抑制剤である。

【0018】上記のなかで、本発明が提供する免疫抑制

剤により有効に予防、または治療し得る自己免疫疾患としては、自己免疫性肝炎、慢性関節リウマチ、インスリン依存性糖尿病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、強皮症、重症筋無力症、多発性筋炎・皮膚筋炎、橋本病、自己免疫性血球減少症、シェーグレン症候群、血管炎症候群、全身性エリテマトーデス等の自己免疫疾患である。

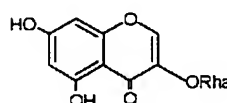
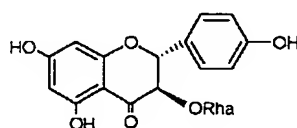
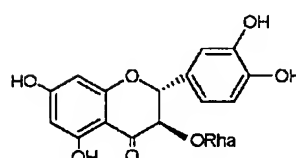
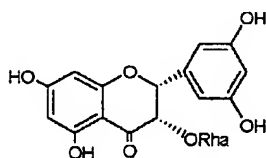
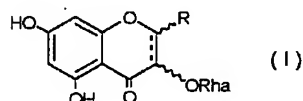
【0019】また、アレルギー疾患としては、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、あるいは花粉症等のアレルギー疾患である。

【0020】本発明の免疫抑制剤は、これらの自己免疫疾患あるいはアレルギー疾患に対しても、活性化T細胞を選択的に抑制することにより、副作用が少なく、臨床的に極めて有効に予防、または治療し得ることが判明した。

【0021】これらの活性化されたT細胞を選択的に抑制する作用物質は、例えば、後記する遅延型過敏反応誘発マウスの活性化T細胞に対するアポトーシスを測定する方法で選択することができる。本発明者らの検討によれば、そのような遅延型過敏反応誘発マウスの活性化T細胞に対するアポトーシスを誘導する作用物質として、特に、次式(Ⅰ)：

【0022】

【化3】



【0027】本発明が提供する免疫抑制剤における有効成分としての上記フラボノイド類またはクロモン類のうち、いくつかの化合物は公知の化合物でもある。しかしながらこれらの化合物については、その抗炎症効果が検討されていたのみであり、このものに免疫異常を改善する作用があることは何ら知られていなかったものである。

【0028】そのなかでも、式(Ⅰ-a)で示されるスミチルビン(Ⅰ-a)は本発明者により見出された全く新規な化合物であり、したがって、本発明はまた別の態様として、上記式(Ⅰ-a)で示されるスミチルビン自体をも提供するものである。

【0023】(式中、Rは、水素原子または、1または2個の水酸基により置換されたフェニル基を表し、Rhaは、 α -L-ラムノース残基を表し、点線は、二重結合の存在または不存在を表す。)で示されるフラボノイド類またはクロモン類が好ましいものであることを確認した。

【0024】したがって、本発明のより具体的な免疫抑制剤としては、活性化T細胞を選択的に抑制する作用物質として、上記式(Ⅰ)で示されるフラボノイド類またはクロモン類を有効成分として含有する免疫抑制剤である。

【0025】これらの中でも、特に、前記式(Ⅰ)中、Rが水素原子であるクロモン類、または4-ヒドロキシフェニル基、3,4-ジヒドロキシフェニル基、または3,5-ジヒドロキシフェニル基であるフラボノイド類が好ましく、より具体的には、次式(Ⅰ-a)で示されるスミチルビン(smitilbin)、(Ⅰ-b)で示されるアスチルビン(astilbin)、(Ⅰ-c)で示されるエンゲルチン(engeletin)または(Ⅰ-d)で示されるエウクリフィン(eucryphin)であり、最も好ましい化合物は式(Ⅰ-d)のエウクリフィンである。

【0026】

【化4】

【0029】

【発明の実施の形態】以下に本発明が提供する免疫抑制剤の詳細を、例えば、遅延型過敏反応誘発マウスの活性化T細胞に対するアポトーシスを誘導する、具体的フラボノイド類またはクロモン類である式(Ⅰ)の化合物を例にとって説明していく。

【0030】本発明が提供する免疫抑制剤における有効成分としての上記式（I）で示されるフラボノイド類またはクロモン類は、例えば、ユリ科の植物である土茯苓（*Smilax glabra* Roxb.）に含まれる化合物である。なお、土茯苓の根茎（*Rhizoma smilacis Glabrae*）は、中国民間において慢性の皮膚疾患、梅毒性皮膚疾患、水銀中毒による皮膚炎などの治療剤として、薬用に供されているものである。

【0031】この土茯苓を、適当な抽出溶媒により抽出し、精製することにより、式（I）で示されるフラボノイド類またはクロモン類、より具体的には式（I-a）であるスミチルビン、式（I-b）であるアスチルビン、式（I-c）であるエンゲルチン、ならびに式（I-d）であるエウクリフィン、を、それぞれ単品、かつ純品として単離することができる。

【0032】なお、本発明の免疫抑制剤にあっては、これらフラボノイド類またはクロモン類は、その純品のみを有効成分として含有するものに限られるものではない。それらフラボノイド類またはクロモン類を含有する植物抽出物、例えば土茯苓の抽出物を有効成分として含有するものであってもよいことはいうまでもない。そのような、土茯苓の抽出物としては、抽出液を濃縮し、さらに凍結乾燥することにより得た、粉末状物質、あるいは、抽出液を適宜濃縮して得た抽出エキスを等であってもよい。

【0033】この場合のフラボノイド類またはクロモン類の具体的抽出手段としては、例えば、それを含有する植物、好ましくはその乾燥粉末物を、抽出溶媒と共に常温ないし加熱還流下に浸潤して行うことができる。この場合に使用し得る抽出溶媒としては、中間極性を有する有機溶媒、低級アルコールまたは水を挙げることができる、より具体的には、酢酸エチルエステル、クロロホルム、石油エーテル、メタノール、エタノール、水等である。なお、これらの抽出溶媒は複数の溶媒を混合して使用してもよい。

【0034】また、抽出に際しての植物体またはその乾燥粉末物と抽出溶媒の比率は、一概に限定し得ないが、2～5回程度の複数回の抽出操作を行い、かつ、植物体またはその乾燥粉末物に対する重量比で、全量ほぼ5～10倍量程度の溶媒を使用した抽出操作を行うのが好ましい。

【0035】かくして抽出を行った後、抽出溶媒を適当な量まで濃縮した後、さらに各種の溶液を用いた分配抽出、クロマトグラフィー、イオン交換樹脂処理、膜分離処理等の通常の精製方法に付すことにより、高純度で、かつ単品として単離された本発明のフラボノイド類またはクロモン類を得ることができる。

【0036】なお、本発明の免疫抑制剤に含有される有効成分であるこれらのフラボノイド類またはクロモン類

は、上記により植物体等から単離精製されたもののみならず、化学的合成手段により合成されたものであってもよく、さらには、上記の抽出精製手段の各段階で得られた抽出エキスの状態のものであってもよい。

【0037】本発明の目的である、以上のようにして単離精製された本発明の式（I）で示されるフラボノイド類またはクロモン類が有する、活性化したT細胞に対する選択的な免疫抑制作用は、遅延型過敏反応誘発マウスの活性化T細胞に対するアポトーシスの誘導により確認された。

【0038】すなわち、具体的には、免疫学的に肝障害を惹起させた遅延型過敏反応誘発マウスから単離した肝障害性の肝非実質細胞を、これらのフラボノイド類またはクロモン類の存在下に培養処理したところ、肝非実質細胞の非付着細胞画分についての細胞死が多く、特に、そのDNAのアガロースゲル電気泳動においては、断片化パターン（ラダーパターン）が認められ、その細胞死はアポトーシスによるものであることが判明した。

【0039】この遅延型過敏反応を惹起した肝非実質細胞に対する、式（I）のフラボノイド類またはクロモン類によるアポトーシスを誘導した細胞死は、肝非実質細胞の付着細胞画分にはみられず、非付着細胞画分（主にCD4⁺とCD8⁺T細胞から構成されている）に認められた。その一方でこのような細胞死は、肝実質細胞では観察されず、さらに免疫障害を伴わない正常な肝非実質細胞、ならびに脾臓細胞においても観察されなかった。これらの各点から判断すれば、本発明が提供する式

（I）のフラボノイド類またはクロモン類は、遅延型過敏反応により活性化されたT細胞である免疫細胞（特に肝非実質細胞の非付着細胞）を選択的に抑制しているものであり、有効な免疫抑制作用を有していることが理解される。

【0040】さらに、本発明の式（I）で示されるフラボノイド類またはクロモン類が、活性化したT細胞を選択的に抑制することにより、活性化T細胞起因性の組織障害に対する改善作用を有することは、遅延型過敏反応により免疫的に肝障害を惹起させたマウスに、式（I）のフラボノイド類またはクロモン類を投与したところ、肝実質細胞の組織障害によるALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ）遊離が抑制されることから確認された。

【0041】以上のように、本発明が提供する免疫抑制剤、例えば、式（I）で示されるフラボノイド類またはクロモン類を有効成分として含有する免疫抑制剤は、活性化したT細胞に対し選択的にアポトーシスを誘導させ、その結果、活性化したT細胞を選択的に抑制させるものである。

【0042】したがって、本発明の免疫抑制剤は、活性化したT細胞に起因する免疫異常、例えば、移植に伴う拒絶反応、骨髓（造血幹細胞）移植による移植片対宿主

病、自己免疫疾患、自己免疫疾患や類縁疾患に起因する組織の損傷や感染に伴って起こる炎症反応、組織の線維化さらに臓器機能障害、アレルギー疾患等の治療に特に有効なものであることが理解される。

【0043】本発明が提供する、例えば、式(I)で示されるフラボノイド類またはクロモン類、またはそれらを含む植物抽出物による、活性化T細胞を選択的に抑制する作用物質を有効成分とする免疫抑制剤としての剤形は、特に限定されない。

【0044】例えば、式(I)で示されるフラボノイド類またはクロモン類またはそれらの抽出物を用いて、製剤学的に慣用される賦形剤と共にカプセル剤、錠剤、注射剤等の適当な剤形として経口的または非経口的に投与することができる。具体的には、例えば式(I)のフラボノイド類またはクロモン類、あるいは粉末状の抽出物を使用して、乳糖、澱粉またはその誘導体、セルロース誘導体等の賦形剤と混合したのち、ゼラチンカプセルに充填することによりカプセル剤を調製することができる。

【0045】また錠剤は、上記の賦形剤の他に、カルボキシメチルセルロースナトリウム、アルギン酸、アラビアゴム等の結合剤と水を加えて練合し、必要により顆粒として造粒したのち、さらにタルク、ステアリン酸等の滑沢剤を添加し、通常の圧縮打錠機を用いて錠剤に調製することができる。

【0046】さらに、注射による非経口的投与に際しては、式(I)のフラボノイド類またはクロモン類を、溶解補助剤と共に滅菌蒸留水または滅菌生理食塩水に溶解し、アンプルに封入して注射用製剤とする。この場合、必要により安定化剤、緩衝物質等を含有させてもよい。これらの非経口投与製剤は、静脈内投与、あるいは点滴静注により投与することができる。

【0047】本発明が提供する免疫抑制剤における有効成分である、例えば式(I)で示されるフラボノイド類またはクロモン類または抽出物の投与量は、種々の要因、例えば治療すべき病態、患者の症状、重症度、年齢、合併症等の有無により一概には限定できない。また、投与経路、剤形、投与回数によっても異なるが、一般的に経口投与の場合には、有効成分として、通常0.1~1000mg/日/ヒト、好ましくは1~500mg/日/ヒトの範囲内、また、非経口投与の場合には、経口投与の場合における投与量の約1/100~1/2程度の範囲内で適宜選択し、投与することができる。なお、これらの投与量は、患者の年齢、症状等により適宜増減し得ることはいうまでもない。

【0048】

【実施例】以下に本発明の実施例として、免疫学的に肝障害を引き起こした遅延型過敏反応誘発マウスを用い、本発明における治療剤が、活性化T細胞に対して選択的にアポトーシスを誘導する点を明らかにすることによ

り、本発明の活性化T細胞を選択的に抑制する作用物質を有効成分として含有する免疫抑制剤を、さらに詳細に説明する。なお、本発明の範囲は、これらの実施例の記載により、何ら限定されるものではないことはいうまでもない。

【0049】実施例1：土茯苓抽出物の調製

土茯苓の乾燥粉碎物を用い、10重量倍量の蒸留水を用い、100℃にて1時間の抽出を2回行った。この抽出液をあわせて遠心分離(1700g)し、得られた上清を凍結乾燥することにより、粉末組成物として土茯苓抽出物を11%の収率で得た。この土茯苓抽出物中には、液体クロマトグラフ法で定量した結果、アスチルビンが0.273%含有されているものであった。

【0050】実施例2：土茯苓抽出物ならびに各種フラボノイド類およびクロモン類の調製

a. 抽出および単離操作：乾燥細切した土茯苓6kgを用い、30Lのメタノールに浸漬し、2時間還流下に加熱した。次いで、濾過して抽出液を採取し、残渣は再度18Lのメタノールに浸漬し、同様に処理した。その後、濾過して抽出液を採取した後、残渣を再び18Lのメタノールに浸漬し、同様に処理した。上記3回の処理により得られた抽出液を合わせて減圧下に濃縮して、568gのメタノール抽出物を得た。

【0051】このメタノール抽出物を1Lの水中に懸濁させ、1Lの石油エーテルにて3回抽出し、続いて1Lの酢酸エチルエステルで3回抽出した。これらの各抽出液を濃縮して、石油エーテル抽出物として23g、および酢酸エチルエステル抽出物として80gを得た。

【0052】酢酸エチルエステル抽出物の70gを、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー(シリカゲル：1000g)に供し、クロロホルム-メタノール混合液(19：1および4：1、各2L)で溶出させて、画分Aとして32.5g、画分Bとして28gをそれぞれ得た。

【0053】画分Aの25gを、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー(シリカゲル：500g)に供し、クロロホルム-メタノール混合液(9：1および4：1、各1L)で溶出させて分離し、画分A-1として2.5g、画分A-2として7.5gをそれぞれ得た。

【0054】画分A-2の2.0gをさらに液体クロマトグラフィー(カラム：Cosmosil75C₁₈-OPN)に供し、メタノール-水混合液(2：3および3：2、各200mL)で溶出させて分離し、式(I-d)で示されるエウクリフィン72mgを得た。

【0055】一方、画分Bの28gをさらに液体クロマトグラフィー(カラム：Cosmosil75C₁₈-OPN)に供し、メタノール-水混合液(3：7、1：1および7：3の混液)で溶出させて分離し、式(I-b)で示されるアスチルビンを8.2gと、画分B-2

として11.5gを得た。

【0056】上記の画分B-2について、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカゲル：350g）に供し、クロロホルム-メタノール混合液（9：1、500mL）で溶出させて分離した後、薄層クロマトグラフィーで分離し、式（I-a）で示されるスミチルピンを2.6g、式（I-c）で示されるエンゲルチ

ンを42mg得た。

【0057】これらの操作により得られたフラボノイド類またはクロモン類の収量、および各化合物のメタノール抽出物568gに対する収率をまとめると、以下の表1ようになる。

【0058】

【表1】

	式（I-a） スミチルピン	式（I-b） アフラピノ	式（I-c） エンゲルチン	式（I-d） エフラフィ
収量（g）	2.6	8.2	0.042	0.072
収率（%）	0.523	1.650	0.008	0.071

【0059】b. 構造確認（物性データ）

上記の単離操作により得られた各化合物のうち、公知化合物であるアスチルビン、エンゲルチンおよびエウクリフィンについては、質量分析および核磁気共鳴分析を行い、その構造を確認した。新規化合物である式（I-a）のスミチルピンの構造決定は、以下の物性評価により行った。

【0060】無色針状結晶（クロロホルム-メタノール（9：1）混合液で結晶化時）

融点：179～181℃

比旋光度： $[\alpha]_D -161.4^\circ$ （メタノール、C=0.2）

UV（メタノール）： λ_{\max} （Log ϵ ）=217nm（4.394）、291nm（4.279）

IR： ν_{\max} =3500（OH）、1620（C=O）、1360、1160、1040、970、820、780 cm^{-1}

HR-FAB-MS： m/z =451.1234（計算値： $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_{11}$ ；451.1240）

【0061】 $^1\text{H-NMR}$ （ $\text{DMSO}-d_6$ ）：0.79(3H, d, $J=6.0\text{Hz}$, H-6''), 2.37(1H, m, H-5''), 3.04(1H, t, $J=9.5\text{Hz}$, H-4''), 3.20(1H, dd, $J=9.5$ & 2.9Hz , H-3''), 3.47(1H, brs, H-2''), 4.15(1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, H-3), 4.74(1H, s, H-1''), 5.43(1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, H-2), 5.90(1H, brs, H-6), 5.92(1H, brs, H-8), 6.70(2H, brs, H-4', 6'), 6.81(1H, brs, H-2'), 11.63(1H, s, OH-5)

【0062】 $^{13}\text{C-NMR}$ （ $\text{DMSO}-d_6$ ）：80.85(C-2), 74.38(C-3), 193.64(C-4), 164.75(C-5), 101.19(C-6), 167.77(C-7), 96.20(C-8), 163.30(C-9), 97.30(C-10), 127.38(C-1'), 115.00(C-2'), 145.86(C-3'), 116.18(C-4'), 145.62(C-5'), 118.87(C-6'), 99.55(C-1''), 71.01(C-2''), 71.01(C-3''), 72.11(C-4''), 69.84(C-5''), 18.11(C-6'')

【0063】また、式（I-a）の化合物を酸による加水分解を行い、その結果得られた生成物のRf値は、ラムノース-水和物と一致した。

【0064】以下の各実施例での試験においては、上記実施例1で得た土茯苓抽出物、あるいは実施例2で得た化合物を使用した。

【0065】実施例3：マウス肝障害モデルの検討

試験1：遅延型過敏反応誘発マウスの作製およびその評価

a. 方法：6～8週齢のBALB/c系マウス（雄性ならびに雌性；体重 $22 \pm 2\text{g}$ ）を用い、その腹部皮膚上に、1%のピクリルクロライドのエタノール溶液0.1mlを、5日間隔で2回塗布して、抗原感作を行った。2回目の抗原感作の5日後に、血液を一部採取した後、0.2%のピクリルクロライド含有のオリーブ油10 μl をマウス肝臓内に注射し、続いて6, 12, 18および24時間後に、マウスからの採血、ならびに脾臓細胞、肝非実質細胞および肝実質細胞の単離を行った。

【0066】採取した血液は、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）の活性測定に供した。

【0067】一方、脾臓細胞ならびに肝非実質細胞の両者を、抗マウスLFA-1（lymphocyte function associated antigen-1）抗体により、また、肝実質細胞を抗マウスICAM-1（intercellular adhesion molecule-1）抗体でそれぞれ処理をした。洗浄後、FITC標識ヤギ抗ラットIgG抗体で染色し、PBSで洗浄して再浮遊した後、FACScan（Becton Dickinson）にて、それぞれの細胞表面分子の発現を測定した。

【0068】さらに、正常マウス、ならびに肝障害を惹起した0, 6, 12, 18および24時間後のマウスから単離した肝非実質細胞または脾臓細胞と、肝実質細胞を共培養し、その各培養上清中におけるALTの遊離についての検討を、以下の方法により行った。

【0069】肝実質細胞（ $1 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ ）を、WE液体培地（2mMのL-グルタミン、10%（v/v）牛胎児血清、100U/mlのペニシリンおよび100 $\mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンを含有する

ウィリアムズ培地E)を用い、24穴プレートにて5時間、5% (v/v) の二酸化炭素濃度エアー条件下で、37℃にて前培養した。次いで、この前培養処理した肝実質細胞を、WE液体培地にて2回洗浄した後、肝非実質細胞 (4×10^5 cell/ml) あるいは脾臓細胞 (5×10^6 cell/ml) と一緒に、それぞれ同条件下にて、さらに3時間共培養した。培養後、培養上清中のALT活性を測定した。

【0070】b. 結果:

その1: 肝障害を惹起させたマウスにおける血清中ALT活性の経時的変動、および脾臓細胞と肝非実質細胞におけるLFA-1発現、ならびに肝実質細胞におけるICAM-1発現の変動を経時的に観察し、併せて肝障害マウスにおける肝細胞の組織形態学的な経時変化を観察した。

【0071】その結果、肝障害惹起の6時間後に脾臓細胞でのLFA-1の発現は最大値を示した。一方、肝非実質細胞でのLFA-1の発現ならびに肝実質細胞でのICAM-1の発現は、12時間後に最大値を示し、血清中ALT活性は、18時間後に最大値を示した。

【0072】さらに肝細胞の形態組織学的変化としては、肝障害惹起時(0時間)では、肝細胞は正常であったものの、6時間後においては穏やかな炎症性細胞浸潤が観察されており、さらに12時間後では著しい炎症性細胞浸潤が観察された。その後18時間では大量の肝細胞がネクロシスを起こしているのが観察された。

【0073】その2: 肝障害惹起後の肝実質細胞に対する、肝非実質細胞および脾臓細胞によるALT遊離の経時変化、ならびに正常マウスおよび肝障害惹起12時間後のマウスから単離された肝非実質細胞あるいは脾臓細胞を、肝実質細胞と共培養した場合の、培養上清中のALTの遊離の変化を観察した。

【0074】その結果、ALTの遊離は、肝非実質細胞では、肝障害惹起12時間後に最大値を示し、脾臓細胞では6~12時間後に最大であった。その遊離活性の強度は、肝非実質細胞のほうが脾臓細胞よりも強く、約12.5倍の遊離活性を示した。

【0075】以上の結果から判断すると、ピクリクロライドをマウスの腹部皮膚に5日間隔で2回塗布して抗原を感作した後、5日後に同一抗原であるピクリクロライドを肝臓内に注射し、肝障害を惹起させることにより、活性化T細胞を作製することが可能となる。特に、ピクリクロライドを肝臓内に注射した12時間後には、肝非実質細胞でのLFA-1の発現、および肝実質細胞でのICAM-1の発現が最大になり、強い免疫反応が生じていることが確認された。

【0076】この強い免疫反応が生じている段階では、血清中のALT活性が高い値を示したことから、免疫反応により肝障害が引き起こされていることが確認された。また、ピクリクロライドを肝臓内に注射した12

時間後のマウスから単離した肝非実質細胞と肝実質細胞を共培養したときに、上清中のALT活性が最大を示したことから、この方法が、インビトロの系として、活性化T細胞の選択的抑制作用の確認試験として代用できることが確認された。

【0077】すなわち、ピクリクロライドによる経皮抗原感作後、さらにピクリクロライドを肝臓内に注射して12時間後のマウスが、免疫的に肝障害を惹起させた遅延型過敏反応誘発マウスとして、活性化したT細胞の選択的抑制を検討するために、最も好ましい試験系であることが判明した。したがって、以下の実施例における各試験は、抗原であるピクリクロライドで経皮感作後に、さらに抗原を肝臓内に注射して12時間後の肝障害マウスを対象に実施することとした。

【0078】実施例4: アスチルビンおよび土茯苓抽出物の作用の検討

試験1. マウスの肝障害モデルの作製

実施例3に記載した方法に準じて、6~8週齢のBALB/c系マウス(雄性; 体重 22 ± 2 g)および6~8週齢のICR系マウス(雄性; 体重 22 ± 2 g)を使用し、その腹部皮膚上に、1%のピクリクロライドのエタノール溶液0.1 mlを、5日間隔で2回塗布して、抗原感作を行った。2回目の抗原感作の5日後に、血液を一部採取した後、0.2%のピクリクロライド含有のオリーブ油10 μ lをマウス肝臓内に注射して肝障害を惹起し、惹起12時間後に、マウスから採血を行なうとともに、肝細胞を単離した。

【0079】採取した血液について、常法によりALTおよびASTの活性を測定した。一方、正常および肝障害マウスから2段階灌流法により単離した肝細胞を、さらに肝実質細胞と肝非実質細胞に分離し、この分離した細胞を直ちに共培養試験、あるいはアポトーシス測定に供した。

【0080】さらに、肝非実質細胞の一部を、培養皿上で3時間培養して、付着細胞画分と非付着細胞画分に分離した。なお、単離した肝実質細胞および肝非実質細胞の両者は、トリパンブルーで染色した結果、約90%の細胞が生存していることを確認した。

【0081】試験2. アポトーシス確認試験1(細胞死数の測定)

a. 方法: 肝障害を惹起して12時間後のマウスから単離した、肝実質細胞および肝非実質細胞、ならびに肝非実質細胞を分画して得た付着細胞画分および非付着細胞画分のそれぞれを、アスチルビンならびに土茯苓抽出物を試験対象薬物とし、その 5×10^{-5} g/ml濃度溶液と共に、RPMI 1640培養液中で37℃、1時間の条件下で培養を行い、培養後の各細胞死数の変化を、Hoechst 33342 (Molecular Probes, Inc., USA) 染色により観察した。なお、対照として、薬物処理を行わなかった場合の各細胞をおいた。

【0082】細胞死の観察は、Hoechst 33342染色により、細胞の断片化あるいは凝縮した核を有する死んだ細胞数で測定した。すなわち、RPMI 1640培養液中の細胞を、室温で1分間染色した後、同培養液で3回洗浄を行い、2%ホルムアルデヒド含有のリン酸緩衝液(PBS溶液)で固定した。200個の細胞を、異なる5個所で蛍光顕微鏡下観察し、全母集団中の細胞死を起こした細胞数を測定した。

【0083】b. 結果：図1に、肝障害を惹起したマウスから単離した、肝非実質細胞および肝実質細胞の細胞死に対するアスチルビンおよび土茯苓抽出物の効果を示した。

【0084】図中の結果からも明らかなように、対照群である薬物未処理の肝実質細胞および肝非実質細胞全体では、細胞死を起こした細胞数の比率は、それぞれ約10%と5%程度であった。これに対してアスチルビンおよび土茯苓抽出物を、その $5 \times 10^{-5} \text{ g/ml}$ の濃度で共存させると、肝非実質細胞全体中での細胞死を起こした細胞数の割合が、明らかに増加しているが、肝実質細胞ではこのような変化は観察されなかった。

【0085】一方、肝非実質細胞の非付着細胞画分では、両薬物ともに、細胞死を起こした細胞数の割合を明らかに増加させたが、付着細胞画分では細胞死数に変化が見られなかった。

【0086】試験3. アポトーシス確認試験2：断片化DNAパターンの確認(アガロースゲル電気泳動)

a. 方法：正常なマウス、および肝障害惹起12時間後のマウスから単離した肝非実質細胞を、アスチルビンまたは土茯苓抽出物で処理した後、アガロースゲル電気泳動を行い、断片化DNAの測定を行った。

【0087】すなわち、正常なマウスおよび肝障害惹起12時間後のマウスから単離された肝非実質細胞を、そのまま、または $5 \times 10^{-5} \text{ g/ml}$ 濃度のアスチルビンまたは土茯苓抽出物とともに、RPMI 1640培養液中で37℃、1時間の条件下で培養した。

【0088】次いで、それぞれの細胞の 10^6 個を洗浄し、遠心して得られた沈殿物を、0.2% Triton X-100含有Lysing buffer(10mMのTris, 1mMのEDTA, pH7.5) 0.6mlに再懸濁して、氷冷下に10分間放置した後、遠心した(20000g)。得られた上清を、等量のTE飽和フェノールと混合し、2〜3分間穏やかにかき混ぜた後、遠心し、上清をクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)混液と混合し、さらに20000gにて遠心した。得られた上清を、0.3M NaClと70%エタノール中で、-20℃の条件下に一夜放置し、DNAを沈殿させた。

【0089】沈殿させたDNAに、 1 mg/ml のRNase A $1 \mu\text{l}$ を加え、37℃にて30分間インキュベートした。インキュベート終了後、この溶液に1/

10容量のLoading buffer(0.02%のプロモフェノールブルー、0.02%のxylene cyanol FF、50%のグリセロール、0.1%のSDS含有)を加えた。2%アガロースゲルを用い、50vで75分間電気泳動を行い、臭化エチジウムを用いて、DNA断片を検出した。

【0090】b. 結果：正常マウス、および肝障害を惹起したマウスの肝非実質細胞から単離したDNAのアガロースゲル電気泳動パターン、およびアスチルビンおよび土茯苓抽出物で処理した肝非実質細胞のDNAのアガロースゲル電気泳動パターンを比較すると、肝障害を惹起したマウスから単離した肝非実質細胞では、アスチルビンおよび土茯苓抽出物で処理したときに、DNAのラダーパターンが観察された。

【0091】一方、正常なマウス由来の肝非実質細胞および脾臓細胞では、両薬物で処理を行っても、そのようなDNAの断片化が見られなかった。すなわち、正常マウスの肝非実質細胞および脾臓細胞にはアポトーシスの誘導は観察されなかった。

【0092】これらのDNAのアガロースゲル電気泳動パターンからみれば、抗原(ピクリルクロライド)投与12時間後の肝障害を惹起したマウスから単離された、肝非実質細胞に対するアスチルビンによる細胞死は、アポトーシスであることが判明する。なおこの結果は、上記試験2における、Hoechst 33342染色試験で、正常な肝非実質細胞での細胞死が認められなかった結果と一致するものであった。

【0093】ところで、本発明者のこれまでの検討によれば、ピクリルクロライドによる経皮感作後に、肝臓に同じ抗原を投与した場合には、肝非実質細胞内に含まれる細胞集団の組成が大きく変化することを、フローサイトメトリー(流量血球計算分析)で確認している。そして、抗原投与前に脾臓を摘出すると、肝障害の有無とその程度を知るための指標である血清中ALT活性レベルが低くなることから、脾臓からリンパ球が肝臓へ浸潤して局在化し、肝非実質細胞の組成が変化することが肝障害に至る主要因であることを確認してきている。

【0094】また、実施例3の試験結果からも明らかなように、抗原投与12時間後には、組織学上炎症性細胞湿潤の程度と肝非実質細胞の肝細胞障害作用がインビトロで最大に達しており、この段階での肝非実質細胞はLFA-1陽性細胞が約72.6〜78%であり、またCD4⁺T細胞47.9%およびCD8⁺T細胞23.2%で構成されているものであることが判明している。このような肝非実質細胞を、抗CD4モノクローナル抗体-補体で処理すると、肝実質細胞からのALTの遊離が完全に抑制され、抗CD8抗体では、ALTの遊離の抑制傾向が観察されている。

【0095】かかる事実を踏まえ、本実施例4のこれまでの試験の結果を考察すると、アスチルビンおよび土茯

苓抽出物による細胞死の誘導は、肝非実質細胞の付着細胞画分ではなく、非付着細胞画分で認められている。したがって、アスチルビンおよび土茯苓抽出物は、肝非実質細胞の非付着細胞画分を主に構成するTリンパ球集団に対し作用していることは明白であるといえる。

【0096】また、両薬物ともに、肝実質細胞と、正常マウスの肝非実質細胞および脾臓細胞には細胞死を誘導しなかったことからみれば、活性化された主にT細胞である免疫細胞が、アスチルビンおよび土茯苓抽出物により、選択的に阻害されることが明らかとなった。

【0097】試験4. ALTの遊離抑制試験(その1)
a. 方法: 実施例3の方法により、肝障害惹起12時間後のマウスから、肝実質細胞および肝非実質細胞を単離した。単離した肝実質細胞を、WE液体培地中に分散し、 2×10^4 cell / 0.2 ml を96穴プレートにまき、37℃にて、5%二酸化炭素濃度エアーの条件下で5時間培養した。

【0098】次いで、培養細胞をWE液体培地で2回洗浄した後、各種濃度のアスチルビンまたは土茯苓抽出物と、37℃、1時間の条件下で処理した 8×10^4 個の肝非実質細胞とともに、同条件下にてさらに3時間共培養した。培養終了後、培養上清を常法により集め、上清中のALTならびにAST活性を測定した。

【0099】b. 結果: 図2に、その結果を示した。図中の結果から明かなように、肝実質細胞を、肝非実質細胞と3時間共培養することにより、ALTおよびASTの遊離レベルが著しく亢進されている。これに対して、共培養させる肝非実質細胞を、アスチルビンあるいは土茯苓抽出物と前処理することにより、肝実質細胞からのALTの遊離は濃度依存的に抑制され、ASTの遊離はアスチルビンにより濃度依存的に抑制されている。特に、アスチルビンと土茯苓抽出物の両方においては、 5×10^{-5} g / ml の濃度で、ALTの遊離を完全に抑制していることが理解される。

【0100】試験5. ALT遊離抑制試験(その2)
a. 方法: 上記試験4と同様に、肝障害惹起12時間後のマウスから肝非実質細胞および肝実質細胞を単離した。単離した肝実質細胞を、WE液体培地中に分散し、 2×10^4 cell / 0.2 ml を96穴プレートにまき、37℃にて、5%二酸化炭素濃度エアーの条件下で5時間培養した。

【0101】次いで、培養細胞をWE液体培地で2回洗浄した後、 5×10^{-5} g / ml 濃度のアスチルビンまたは土茯苓抽出物で37℃にて5, 15, 30, 60および120分間前処理した肝非実質細胞(それぞれ 8×10^4 個)とともに、同条件下にてさらに3時間共培養した。培養終了後、培養上清を常法により集め、上清中のALT活性を測定した。

【0102】b. 結果: 図3にその結果を示した。図中の結果からも明かなように、肝非実質細胞をアスチル

ビンあるいは土茯苓抽出物と前処理することにより、時間依存的に肝実質細胞からのALTの遊離が抑制されており、30分間以上の処理によりその遊離が完全に抑制された。なお、肝実質細胞については、高濃度のアスチルビンあるいは土茯苓抽出物で2時間以上前処理しても、ALTの遊離に変化は認められなかった。

【0103】試験6. 経口投与による遊離ALT活性試験

a. 方法: 6~8週齢のBALB/c系マウス(雄性; 体重 22 ± 2 g)および6~8週齢のICR系マウス(雄性; 体重 22 ± 2 g)を使用した。マウスをピクリクロライドにより試験1と同様により経皮感作した後、肝臓内に抗原投与して0, 5および10時間後に、アスチルビンの100 mg / kg、および土茯苓抽出物の200 mg / kgのそれぞれを、経口投与した。最終投与の2時間後に、マウスから採血を行い、血清中のALT活性を測定した。また、肝非実質細胞と肝実質細胞を単離して、共培養し、得られた培養上清中のALT活性測定値と比較した。

【0104】b. 結果: 図4にその結果を示した。図中の結果より明かなように、アスチルビンまたは土茯苓抽出物を経口投与したマウスでは、対照群と比較して、明らかに血清中ALT活性が減少するとともに、単離した肝非実質細胞の肝実質細胞に対する細胞障害性も有意に低下した。この結果は、肝障害マウスから単離した肝非実質細胞をアスチルビンまたは土茯苓抽出物で処理した後に肝実質細胞と共培養するとき、対照群と比較して、培養上清中ALT活性が減少し、肝実質細胞に対する細胞障害性が有意に低下したことと良く一致している。

【0105】試験7. 薬物の投与時期の影響検討

a. 方法: 試験1と同様にしてマウスに肝障害を惹起させた。その中でアスチルビンおよび土茯苓抽出物のinduction phaseに対する効果を検討するために、抗原であるピクリクロライドを最初に経皮感作してから10日間、毎日1回ずつ、また、effect or phaseに対する効果を検討するために、肝臓内に抗原投与後0, 5, 10時間後の計3回に、アスチルビン(50 mg / kgおよび100 mg / kg)ならびに土茯苓抽出物(100 mg / kgおよび200 mg / kg)を経口投与した。なお、対照群として薬物の投与をしないマウス、ならびに活性対照群として、免疫抑制剤であるシクロフォスファミド(Cy)の10 mg / kgを腹腔内投与したマウスをおいた。

【0106】ピクリクロライドの肝臓内投与の18時間後に、各マウスから採血を行い、常法に従い、血清中のALT活性を測定した。なお、併せて肝臓の病理組織学的検討を行った。

【0107】b. 結果: 図5に、アスチルビン、土茯苓抽出物およびシクロフォスファミドが、肝障害マウスに

における血清中ALTの上昇に与える効果について示した。図中の結果から明らかなように、対照群では、正常値よりも、血清中ALT活性が著しく上昇している。対照群と比較すると、アスチルビンまたは土茯苓抽出物の高用量を、effector phaseに投与した場合には、明らかにALT活性が減少し、低用量では、減少の傾向が観察され、肝障害改善作用が認められた。これに対して、induction phaseに投与した場合には、肝障害改善作用はほとんど見られなかった。

【0108】なお、免疫抑制剤であるシクロフォスファミドは両phaseでの投与においても、明らかにALT活性を減少させていた。病理組織学的検討においては、対照群における主変化は、炎症性細胞浸潤と肝実質細胞の凝固壊死であった。アスチルビンまたは土茯苓抽出物投与群、ならびにシクロフォスファミド投与群において、ALT活性が減少し、肝障害改善作用が認められたほとんどのマウスでは、病理組織学的変化の改善作用が認められた。

【0109】以上の各試験の結果よりみれば、アスチルビンおよび土茯苓抽出物は、遅延型アレルギー反応(DTH反応)のinduction phaseではなく、effector phaseで投与することにより、血中ALT活性とAST活性の上昇を明らかに抑制していることが判明する。肝非実質細胞をアスチルビンあるいは土茯苓抽出物で前処理したときには、濃度依存的にALTおよびASTの遊離を抑制しており、アスチルビンの方が土茯苓抽出物よりも強い抑制作用を示している。

【0110】また、アスチルビンと土茯苓抽出物の両方

においては、その $5 \times 10^{-5} \text{ g/ml}$ の濃度で、肝非実質細胞を30分間以上前処理すると、ALTの遊離が完全に抑制され、肝非実質細胞の機能である肝細胞障害作用が完全に抑制されることが確認された。しかしながら、共培養前に肝実質細胞をアスチルビンまたは土茯苓抽出物で処理しても、肝非実質細胞による潜在的な肝細胞障害作用を抑制することはできなかった。以上の結果からは、活性化した主にT細胞からなる免疫細胞の機能を選択的に除去することにより、肝障害に対する改善作用を示すことが確認された。

【0111】試験8. 四塩化炭素で誘導した肝障害モデルマウスに対する評価

a. 方法: ICR系雄性マウスを1群8匹使用し、アスチルビン(50mg/kgあるいは100mg/kg)および土茯苓抽出物(100mg/kgあるいは200mg/kg)を6日間、経口投与した。最終投与の1時間後、各マウスに、0.2%四塩化炭素含有のオリーブ油を、0.2ml/20gの体重当たりの用量で腹腔内投与した。なお対照として、正常マウス群である薬剤の無投与/四塩化炭素無投与群を、対照群として四塩化炭素のみの投与群をおいた。また、活性対照群としてBDD(ピフェニル ジメチル ジカルボキシレート)の150mg/kg投与群をおいた。四塩化炭素投与から20時間後に各マウスから採血し、常法に従い、血清中のALT活性およびAST活性を測定した。

【0112】b. 結果: それらの結果を、まとめて表2に示した。

【0113】

【表2】

群	用量 (mg/kg)	ALT (Karmen unit)	AST (Karmen unit)
正常マウス群	—	244.0 ± 23.4	215.0 ± 23.2
対 照 群 (四塩化炭素のみ投与群)	—	947.5 ± 27.5	669.4 ± 45.4
アスチルビン 投与群	50 100	901.6 ± 36.1 921.5 ± 40.2	670.4 ± 21.2 688.2 ± 45.6
土茯苓抽出物 投与群	100 200	920.7 ± 69.2 899.3 ± 37.1	662.9 ± 37.1 638.1 ± 48.2
BDD投与群	150	510.7 ± 27.0*	675.6 ± 80.9

*P<0.01 対照群と比較

【0114】表中の結果から明らかなように、四塩化炭素投与群では血中ALT活性およびAST活性が著しく上昇したが、これに対するアスチルビンおよび土茯苓抽出物の影響は認められなかった。BDDはALTの上昇を著しく抑制した。

【0115】試験9. 四塩化炭素によるマウス肝細胞障

a. 方法: 試験8に使用したマウスと同様の正常なマウスから、肝実質細胞を単離し、アスチルビンあるいは土茯苓抽出物で2時間処理した。次いで細胞をWE液体培地で2回洗浄後、0.2%四塩化炭素含有オリーブ油の0.1mlを添加し、さらに1時間反応させた。反応終了後、上清中のALT活性を測定した。

【0116】b. 結果：アスチルビンおよび土茯苓抽出物の両者は、それぞれ $5 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ g/ml}$ 濃度で、四塩化炭素で障害を与えたマウス肝実質細胞からのALTの遊離に、なんらの影響を及ぼさなかった。

【0117】この結果から明らかなように、アスチルビンと土茯苓抽出物の両者を、肝実質細胞の前処理に用いても、四塩化炭素による肝細胞障害に対して、保護作用がみられなかった。また、両薬物を予防的に6日間投薬しても、マウスにおいて四塩化炭素により誘導される肝障害に対して、改善作用を示さなかった。これらの結果よりみれば、アスチルビンおよび土茯苓抽出物は、これまでに知られているような肝細胞の保護作用ではなく、活性化した主にT細胞からなる免疫細胞の機能を選択的に抑制して、肝障害改善作用を示すものであることが判明した。

【0118】実施例5：各種フラボノイド類またはクロモン類の作用

試験1. ピクリルクロライドによる肝障害モデルマウスの作製

6ないし8週の雄性BALB/c系マウスを使用した。実施例4の試験1と同様に、マウスの腹部皮膚上に、0.1%のピクリルクロライドを含有するエタノール溶液の0.1mlを、5日間隔で2回塗布して、抗原感作を行った。

【0119】2回目の感作の5日後に、0.2%のピクリルクロライド含有オリーブ油の $10 \mu\text{l}$ を肝臓内に投与した。その12時間後、2段階灌流法の変法により、肝実質細胞および肝非実質細胞を単離した。次いで、単離した肝実質細胞および肝非実質細胞を、トリパンブルー染色により評価し、約90%の各細胞が生存していることを確認し、以下の各薬物との処理ならびに共培養の試験に用いた。

【0120】試験2. 細胞培養およびALTの遊離試験（肝非実質細胞の前処理）

a. 方法：WE液体培地中の肝実質細胞（ $2 \times 10^4 \text{ cell}/0.2 \text{ ml}$ ）を96穴のプレートにまき、 37°C にて、5%二酸化炭素濃度エア条件下にて培養を行った。一方、肝非実質細胞を培地単独、あるいは各種濃度の試験化合物を溶解した培地中で1時間反応させることにより、薬物処理を行った。なお、試験薬物としては、式（I-a）、（I-b）、（I-c）および（I-d）で示されるスミチルビン、アスチルビン、エンゲルチン、エウクリフィンを用いた。

【0121】5時間後に、肝実質細胞の単層を培地で2回洗浄し、上記薬物で処理した肝非実質細胞、あるいは処理していない肝非実質細胞のそれぞれ $8 \times 10^4 \text{ cell}$ を添加した。添加後、さらに3時間共培養し、常法により、集めた上清中のALT活性を測定した。

【0122】b. 結果：図6にその結果を示した。図中の結果からも明らかなように、薬物未処理の肝非実質細胞

（対照群）では、培養上清中のALT活性値が著しく上昇している。これに対して、フラボノイド類のなかで類似構造を持つアスチルビン、スミチルビン、エンゲルチンは、濃度依存的にALTの遊離を抑制しており、その抑制強度は3者とも同程度であり、クロモン類であるエウクリフィンが、最も強い抑制作用を示していることが理解される。

【0123】以上の結果から判断すると、本発明のフラボノイド類またはクロモン類は、肝臓に浸潤した非実質細胞、すなわち活性化T細胞の機能を不活化することにより肝細胞障害作用を抑制しているといえる。

【0124】試験3. 細胞培養およびALTの遊離試験（肝実質細胞の前処理）

a. 方法：肝実質細胞をWE液体培地の単独、あるいは各種濃度の試験化合物を溶解した培地とともに1時間反応させて、薬物処理した。次いで、薬物処理を行った肝実質細胞、あるいは薬物処理を行わなかった肝実質細胞の $2 \times 10^4 \text{ cell}/0.2 \text{ ml}$ を96穴のプレート上にまき、 37°C にて、5%二酸化炭素濃度のエア条件下に培養を行った。

【0125】5時間後に、肝実質細胞の単層を培地で2回洗浄し、 $8 \times 10^4 \text{ cell}$ の肝非実質細胞を添加し、さらに3時間共培養し、常法により、集めた上清中のALT活性を測定した。なお、試験化合物は上記試験2と同様のものを使用した。

【0126】b. 結果：その結果、各試験化合物を肝実質細胞の前処理に用いたときには、肝非実質細胞との共培養によるALTの遊離に影響を及ぼさなかった。

【0127】試験4. 細胞培養およびALTの遊離試験（四塩化炭素に対する影響）

a. 方法：正常なマウスから単離された肝実質細胞を用い、2時間にわたり試験化合物で処理をした。なお、試験化合物との未処理群を対照としておいた。処理終了後、細胞を2回洗浄した後、0.2%の四塩化炭素を0.1ml添加し、さらに1時間反応させ、常法により、集めた上清中のALT活性を測定した。試験化合物は、上記試験2と同様のものを使用した。

【0128】b. 結果：試験化合物であるスミチルビン、アスチルビン、エンゲルチンおよびエウクリフィンは、いずれも $5 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ g/ml}$ の濃度で、四塩化炭素で障害を与えたマウス肝実質細胞からのALTの遊離を抑制せず、肝細胞保護作用を示さなかった。したがって、これらの化合物には、これまでに肝細胞保護剤で見られていたような、肝細胞膜の安定化のような、肝細胞保護作用をもたないものであり、むしろ、活性化T細胞を選択的に抑制する肝機能保護作用であることが示された。

【0129】

【発明の効果】以上で詳細に説明したように、本発明の活性化T細胞を選択的に抑制する作用物質を有効成分と

して含有する免疫抑制剤は、活性化したT細胞に起因する疾患の治療、および改善において非常に優れた作用を発揮している。したがって、本発明が提供する免疫抑制剤は、活性化T細胞に起因する免疫異常、例えば、移植に対する拒絶反応、骨髄（造血幹細胞）移植による移植片対宿主病、自己免疫疾患、自己免疫疾患や類縁疾患に起因する組織の損傷や感染に伴って起こる炎症反応、線維化さらに臓器機能障害、アレルギー疾患等の治療に、特に有効なものである。

【0130】その中でも特に、本発明が提供する式(1)のフラボノイド類またはクロモン類は、活性化T細胞を選択的に抑制するものであり、その抑制は、活性

化T細胞に対するアポトーシスの誘導として作用するものである。これらのフラボノイド類またはクロモン類は、例えば、古くから民間で使用されている漢方薬に含まれる成分でもあり、したがって、毒性も低く、その医療上の価値は多大なものであるといえる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例4の試験2の結果を示す図である。

【図2】実施例4の試験4の結果を示す図である。

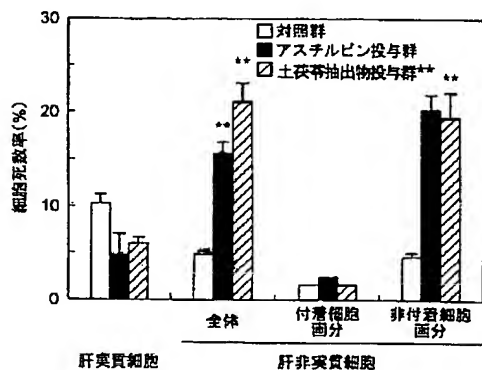
【図3】実施例4の試験5の結果を示す図である。

【図4】実施例4の試験6の結果を示す図である。

【図5】実施例4の試験7の結果を示す図である。

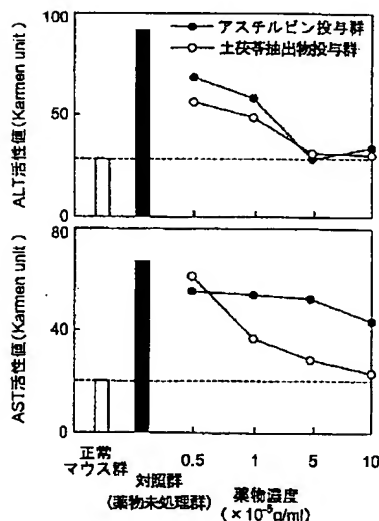
【図6】実施例5の試験2の結果を示す図である。

【図1】

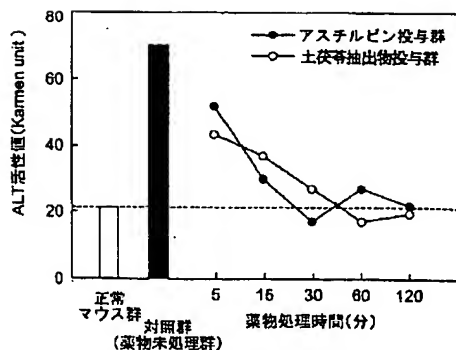


** : $P < 0.01$ 対照群と比較

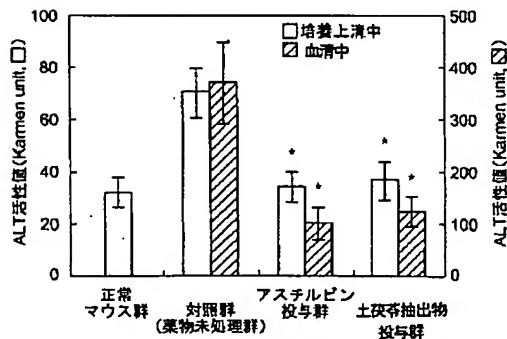
【図2】



【図3】

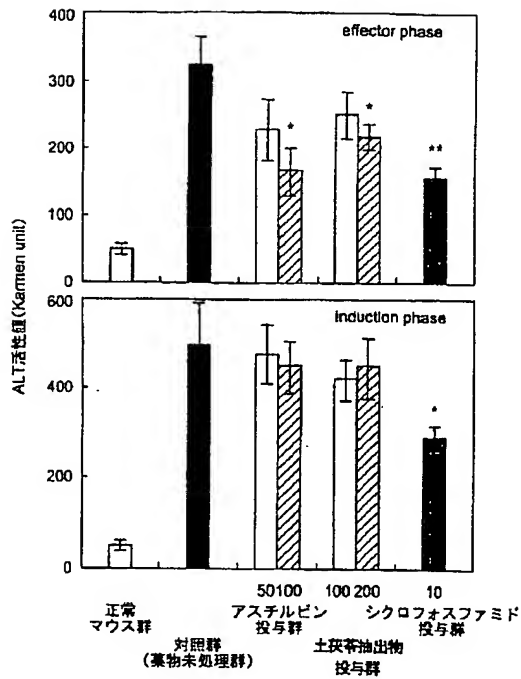


【図4】



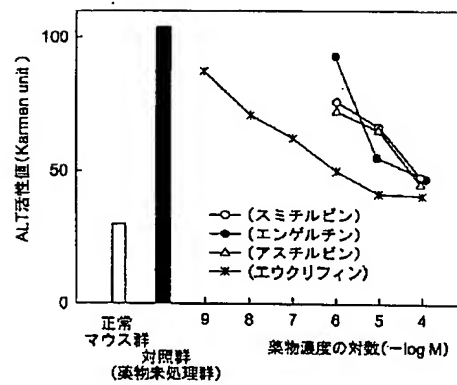
* : $P < 0.05$ 対照群と比較

【図5】



*: P<0.05 対照群と比較
 **: P<0.01 対照群と比較

【図6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テマコード (参考)

A 6 1 P 11/06
 17/04
 25/28
 29/00
 37/02
 37/06
 37/08
 43/00 1 1 1
 C 0 7 H 17/07
 // A 6 1 K 35/78

A 6 1 P 11/06
 17/04
 25/28
 29/00
 37/02
 37/06
 37/08
 43/00 1 1 1
 C 0 7 H 17/07
 A 6 1 K 35/78

V

(72) 発明者 陳 ▲てい▼

中華人民共和国江蘇省南京市馬家街40号5
 幢1 单元602号室

(72) 発明者 小松 かつ子

富山県富山市五福末広町1073 コーポモビ
 リエ1-201

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.